

*Enzymchemische Untersuchungen
zum Nicotinabbau in der Kaninchenleber*

*Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau*

*vorgelegt von
Rolf Sammeck
aus Düsseldorf-Benrath*

1964

Aus dem Biochemischen Institut der Universität
Freiburg im Breisgau
Direktor: Professor Dr. Helmut H O L Z E R

Enzymchemische Untersuchungen zum Nicotinabbau
in der Kaninchenleber.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
einer
H o h e n M e d i z i n i s c h e n F a k u l t ä t
der
Albert-Ludwig-Universität zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Rolf Sammeck
aus Düsseldorf-Benrath
1964

Dekan: Professor Dr.rer.nat.Helmut H O L Z E R
Referent: Priv. Doz.Dr.rer.nat.Karl D E C K E R

Die vorliegenden Untersuchungen wurden in der Zeit vom
1. November 1961 bis 30. April 1964 im Biochemischen Institut
der Universität Freiburg im Breisgau durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Helmut H O L Z E R danke ich besonders
für die Möglichkeit, diese Untersuchungen in seinem Institut
ausführen zu dürfen.

Herrn Priv. Doz. Dr. D E C K E R gilt mein aufrichtiger Dank
für die Überlassung des Themas und für das stets offene
Gespräch, durch dessen vielfältige Anregungen mir bei dem
Verständnis der Probleme dieser Arbeit sehr geholfen wurde.

	Seite
1. Einleitung	1
2. Die Eltern	2
3. Die Kinder	3
4. Die Jugend	4
5. Die Ehe	5
6. Die Familie	6
7. Die Erziehung	7
8. Die Kultur	8
9. Die Wissenschaft	9
10. Die Kunst	10
11. Die Religion	11
12. Die Politik	12
13. Die Wirtschaft	13
14. Die Gesellschaft	14
15. Die Menschheit	15
16. Die Zukunft	16
17. Die Gegenwart	17
18. Die Vergangenheit	18
19. Die Natur	19
20. Die Umwelt	20
21. Die Welt	21
22. Die Erde	22
23. Die Luft	23
24. Die Wasser	24
25. Die Feuer	25
26. Die Erde	26
27. Die Luft	27
28. Die Wasser	28
29. Die Feuer	29
30. Die Erde	30
31. Die Luft	31
32. Die Wasser	32
33. Die Feuer	33
34. Die Erde	34
35. Die Luft	35
36. Die Wasser	36
37. Die Feuer	37
38. Die Erde	38
39. Die Luft	39
40. Die Wasser	40
41. Die Feuer	41
42. Die Erde	42
43. Die Luft	43
44. Die Wasser	44
45. Die Feuer	45
46. Die Erde	46
47. Die Luft	47
48. Die Wasser	48
49. Die Feuer	49
50. Die Erde	50
51. Die Luft	51
52. Die Wasser	52
53. Die Feuer	53
54. Die Erde	54
55. Die Luft	55
56. Die Wasser	56
57. Die Feuer	57
58. Die Erde	58
59. Die Luft	59
60. Die Wasser	60
61. Die Feuer	61
62. Die Erde	62
63. Die Luft	63
64. Die Wasser	64
65. Die Feuer	65
66. Die Erde	66
67. Die Luft	67
68. Die Wasser	68
69. Die Feuer	69
70. Die Erde	70
71. Die Luft	71
72. Die Wasser	72
73. Die Feuer	73
74. Die Erde	74
75. Die Luft	75
76. Die Wasser	76
77. Die Feuer	77
78. Die Erde	78
79. Die Luft	79
80. Die Wasser	80
81. Die Feuer	81
82. Die Erde	82
83. Die Luft	83
84. Die Wasser	84
85. Die Feuer	85
86. Die Erde	86
87. Die Luft	87
88. Die Wasser	88
89. Die Feuer	89
90. Die Erde	90
91. Die Luft	91
92. Die Wasser	92
93. Die Feuer	93
94. Die Erde	94
95. Die Luft	95
96. Die Wasser	96
97. Die Feuer	97
98. Die Erde	98
99. Die Luft	99
100. Die Wasser	100

Meinen lieben Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
A. EINLEITUNG	1
B. I. PRÄPARATE	3
B.II. METHODIK	4
1.) Aufarbeitung der Kaninchenleber	4
2.) Standardansatz	4
3.) Radioanalytische Auswertung des Standardansatzes	4
4.) Dünnschicht- und Papierchromatographie	5
5.) Enzymatische Darstellung und Isolierung von ^{14}C -Cotinin und ^{14}C -Nornicotin	6
6.) Nachweis von enzymatisch gebildetem ^{14}C -Formal- dehyd aus $[\text{}^{14}\text{CH}_3]$ - Nicotin	6
7.) Nachweis von enzymatisch gebildetem $^{14}\text{CO}_2$ aus $\text{L-}[\text{}^{14}\text{CH}_3]$ - Nicotin	7
8.) UV - und IR - Spektrographie	7
C. ERGEBNISSE	8
1.) Versuch am Kaninchen in vivo und mit Kanichen- leberschnitten	8
2.) Die Bildung von Cotinin und seine Identifizierung	9
3.) Die $\text{NADP}\cdot\text{H}_2$ - und O_2 - Bildung von Cotinin und Nornicotin	10
4.) Quantitative Entstehung von Cotinin und Nornicotin	11
5.) Norcotininbildung aus Nornicotin	13
6.) Verlauf der Nicotinoxydation und Metaboliten- entstehung in Abhängigkeit von der Inkubations- dauer	14
7.) Fragliche N'- Demethylierung auf der Stufe des Cotinins	15
8.) Die Frage nach dem Stoffwechsel der abgespalte- nen Methylgruppen	17

9.) Die Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ und $^{14}\text{CH}_2\text{O}$ aus L - [$^{14}\text{CH}_3$] - Nicotinansätzen mit mikrosomen- haltiger Kaninchenleber	18
10.) Erfassung eines Zwischenproduktes der Cotinin- bildung aus Nicotin mit Dimedon	19
DISKUSSION	
1.) Vorzüge der verwendeten Methode	21
2.) Zur quantitativen Cotininentstehung	21
3.) 5'- Hydroxynicotin als Intermediat	22
4.) Zur Frage der Cotinindemethylierung	23
5.) Nornicotinbildung	24
6.) Abhängigkeit der Nornicotinbildung von NADP·H ₂ und O ₂	24
7.) Mechanismus der N'- Demethylierung	25
8.) Nicotin- N'- Oxyd als Zwischenstufe in der Cotinin- und Nornicotinbildung	26
9.) Geringe Substratspezifität der oxydierenden Leberenzyme	28
10.) Vergleich der enzymchemischen Umsetzungen von Nicotin im Säugetierkörper und adaptierten Mikroorganismen	28
11.) Pharmakologische Bedeutung der Nicotin- umwandlung	29
ZUSAMMENFASSUNG	30
LITERATURVERZEICHNIS	31
LEBENS LAUF	33

A. Einleitung

Die beiden Hauptalkaloide des *Nicotiana tabacum*, Nicotin und Nornicotin, sind in ihrer pharmakodynamischen Wirkung schon seit langem bekannt. Erst in jüngerer Zeit begannen Untersuchungen über die biochemische Umwandlung dieser Basen, als man entdeckt hatte, dass Nicotin im Säugetierorganismus einem beträchtlichen Abbau unterliegt (30,39,40,41). So treten im Urin nach Gaben von Nicotin eine Reihe von König-positiven Metaboliten auf, die auf Grund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften bereits identifiziert worden sind (23,24).

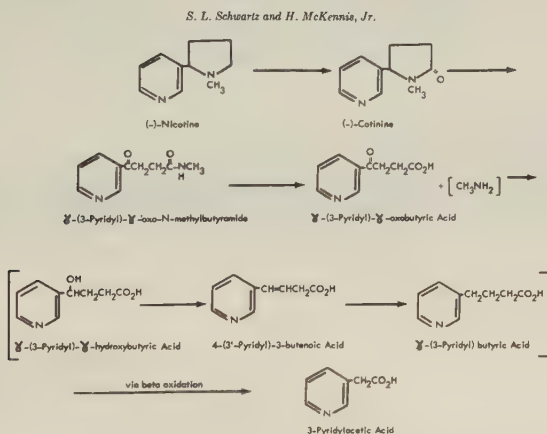


Abb. I: Stoffwechselschema des Nicotinabbaus im Säugetierkörper nach S.L.SCHWARTZ und H.McKENNIS, JR.

Die Ergebnisse dieser Studien erlauben aber keine sicheren Aussagen über die einzelnen Stoffwechselmechanismen, die zum Entstehen dieser Metabolite führen. Zwar haben enzymchemische Untersuchungen bei adaptierten Mikroorganismen (*Arthrobacter oxydans*) die Kenntnisse über die Umwandlungsmöglichkeiten des Nicotins erweitert, jedoch lassen sich die aufgezeigten Stoff-

wechselwege nicht auf den tierischen Organismus übertragen (7,9,10,11,14,16,17,35,36,). Beim Säugetier findet der Nicotinabbau im wesentlichen in der Leber statt (29,39). Andere Organe wie Niere, Lunge und Gehirn zeigen ebenso die Fähigkeit, Nicotin umzusetzen (30,40,41). Die Bildung von L-Cotinin, einem ersten Stoffwechselprodukt des L-Nicotins, gelang H U C K E R et al. im zellfreien Leberextrakt von Kaninchen (18).

Die Aufgabe der vorliegenden Versuche war es, mit der mikrosomenhaltigen Kaninchenleberfraktion tieferen Einblick in die einleitenden Reaktionen des Nicotinstoffwechsels zu gewinnen, wobei besondere Aufmerksamkeit der N'-Demethylierung gewidmet wurde.

B. I. Präparate

Die in diesen Versuchen verwendeten Präparate hatten folgende Herkunft:

L-[$^{14}\text{CH}_3$]- und DL-[2'- ^{14}C]- Nicotin überließ mir freundlicher Weise Dr. D E C K E R, wofür ich sehr danke.

L-Cotinin wurde nach A. P I N N E R (33) hergestellt aus L-Nicotin. (Fp des Monopikrates 105°)

L-Norcotinin, L-Hydroxycotinin und γ -[Pyridyl-(3)]- γ -oxo-N'-methyl-butyramid erhielt ich dankenswerterweise von Professor H. M c K E N N I S, Medical College, Richmond, Virginia, U.S.A.

γ -Pyridyl-essigsäure wurde von der Firma Fluka A.G., Chem. Fabrik Buchs (Schweiz), bezogen.

Tetrahydrofolsäure wurde durch katalytische Hydrierung aus Folsäure (Fa.Riedel-de Haen A.G., Hannover) nach Rabinowtz und Pricer (34) gewonnen.

Alle anderen Chemikalien stammen von den Firmen E. Merck, A.G., Darmstadt, Riedel-de Haen, Seelze, Hannover, Azo-Chemie, Wehr,(Baden) und Packard Instrument Company, La Grange, Illinois, (U.S.A.).

B. II. Methodik

1.) Aufarbeitung der Kaninchenleber:

Frische Leber von 2-3 kg schweren, dekapitierten, ausgebluteten Kaninchen wurde im Gewichtsverhältnis 1:3 in 0,25 M Saccharoselösung (0,01 M Nicotinsäureamid und 0,001 M $MgCl_2$ enthaltend) im Potter-Elvehjem-homogenisator bei 4° homogenisiert. Der bei 9600 x g (15 Min.) zentrifugierte, mikrosomenhaltige Überstand wurde für die folgenden Untersuchungen verwendet. Durch Einfrieren bei -20° behielt er 1-2 Wochen seine volle Aktivität.

2.) Standardansatz:

2 ml des 9600 x g Überstandes, 0,7 g Leberfrischgewicht entsprechend, wurden mit 0,2 M Trispuffer auf ein End-pH von 7,5 gebracht, mit 0,05 μ Mol ^{14}C -markiertem Nicotin (5×10^4 IpM) versetzt und am Warburg-Apparat unter Luftatmosphäre geschüttelt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Eintauchen der Gefäße in flüssiger Luft. Zur Entfernung des nicht umgesetzten Nicotins wurde die Lösung bei 5° alkalisch mit 5 ml n-Heptan ausgeschüttelt. Sodann wurden mit 5 ml Chloroform die Nicotinmetabolite (z. B. Cotinin, Nornicotin, Norcotinin) extrahiert.

3.) Radioanalytische Auswertung des Standardansatzes:

Das nicht umgesetzte Nicotin bestimmte ich durch Aliquot-entnahme aus dem Heptan von 0,05 und 0,1 ml, die ich in einer von DAVIDSON und FEIGELSON (5) angegebenen Dioxan-Dimethoxyäthan-Anisollösung löste, im Tricarb-Liquid-Scintillation-Spectrometer, Typ 314 E, der PACKARD Instrument Company.

Zur quantitativen Bestimmung der entstandenen Cotinin- bzw. Nornicotinmenge wurde der Radioaktivitätsgehalt der jeweiligen wässerigen Inkubationsphasen gemessen, der nach

Heptan- bzw. Chloroformextraktion zurückblieb. Dies geschah durch Aliquotentnahme von 0,01 und 0,02 ml Portionen, die ich in 5,0 ml der oben angegebenen Dioxan-Dimethoxyäthan-Anisollösung suspendierte und im Tricarb-Liquid-Scintillationsspectrometer auswertete.

Den Cotiningehalt errechnete ich aus der Differenz der Radioaktivitätsmenge in der heptan- und chloroformextrahierten Inkubationslösung mit L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Nicotin. Das entstandene Nornicotin bestimmte ich aus dem Radioaktivitätsgehalt des Chloroformextraktes im DL-[2- ^{14}C]-Nicotinansatz (=Differenz der Radioaktivitätsmenge in der heptan- und chloroformextrahierten Inkubationslösung), von dem man noch den Cotininanteil, der oben aus dem L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Nicotinansatz gewonnen wurde, abzieht.

Ein eventuell in sehr geringem Ausmass gebildetes Hydroxycotin wird dabei miterfasst.

4.) Dünnschicht- und Papierchromatographie:

Die Dünnschichtchromatographie wurde nach STAHL(37) auf Kieselgel G, (Fa. E. Merck, Darmstadt), das man im Gewichtsverhältnis von 30 g zu 60 g Wasser verrührt und mit dem Ausstreichgerät der Fa. Desaga (Heidelberg) auf 20 x 20 cm Glasplatten aufträgt, ausgeführt. Als Fliessmittel verwendete ich eine n-Butanol-Äthanol-0,5 N NH_3 -Lösung (im Volumenverhältnis 4:1:1). Die Chromatographiedauer betrug 3 Stunden. Zur Entwicklung wurden die Chromatogramme mit einer 1%igen Lösung von p-Aminobenzoesäure in Äthanol besprüht und anschliessend Bromcyandampf nach einer Methode von KÖNIG (20) ausgesetzt. Die verschiedenen Nicotinmetabolite zeigen dabei charakteristische Farbreaktionen. Durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten liessen sich in diesem System folgende chloroformlösliche Metabolite trennen: Nicotin, Nornicotin, Cotinin, γ -[Pyridyl-(3)]- γ -oxo-N'-methylbutyramid und Nicotinsäureamid. Eine Trennung von Cotinin und Nornicotin erreicht man durch absteigende Papierchromatographie auf WHATMAN Nr. 1 Papier in dem für die Dünnschichtchromatographie verwendeten Fliessmittel.

Für die Trennung von L-Nicotin, L-Nornicotin und L-Cotinin eignet sich auch tert. Amyl-Alkohol-Wasser-p-Aminobenzoesäureäthylester 100:20:0,2 auf einem 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,4 besprühten S S 2045 b M-Papier (22), (Abb.2). Die radiographische Auswertung erfolgte mit Friesseke-Höpfner 49.452 und 407 bzw. FHZ 15a.

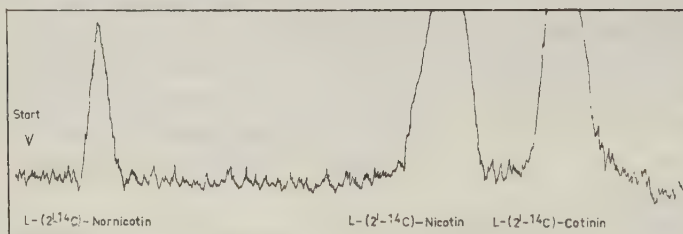


Abb. 2: Papierchromatographische Trennung von Cotinin und Nornicotin, enzymatisch gewonnen aus einer Inkubation von DL-[2'- ^{14}C]-Nicotin mit zellfreiem Kaninchenleberextrakt.

5.) Enzymatische Darstellung und Isolierung von ^{14}C -Cotinin und ^{14}C -Nornicotin:

50 ml des 9600 x g Überstandes wurden inkubiert mit 0,75 μMol L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Nicotin bzw. DL-[2'- ^{14}C]-Nicotin ($1,25 \cdot 10^6$ IpM). Die Reaktionslösung wurde nach 1 Stunde mit 5 ml 6M HClO_4 versetzt und 10 Minuten bei 30000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde alkalisch mit Chloroform mehrmals extrahiert, und die Chloroformextrakte im Vakuum eingengt. Die Trennung der Metabolite erfolgte durch Papierchromatographie. (Abb.2).

6.) Nachweis von enzymatisch gebildetem ^{14}C -Formaldehyd aus L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Nicotin:

14,4 μMol L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Nicotin ($1,25 \cdot 10^6$ IpM) wurden mit 50 ml 9600 x g Überstand und 2,7 mMol Dimedon, in 9 ml 1 M Tris gelöst,

bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach 1 Stunde wurden 1,3 mmole inaktiver Formaldehyd zugesetzt, dann mit 59 ml Alkohol versetzt und das angefällte Protein abzentrifugiert. Nach Ansäuern mit 2 N HCl wurde die Lösung mit 100 ml CHCl_3 extrahiert; aus dem CHCl_3 -Extrakt hinterblieb nach dem Einengen das Formaldehydon als weisser Rückstand, der mehrmals aus Alkohol- H_2O kristallisiert wurde (Fp 189-190°).

7.) Nachweis von enzymatisch gebildetem $^{14}\text{CO}_2$ aus L-[$^{14}\text{CH}_3$]

-Nicotin:

In geschlossenen Warburg-Gefässen erfolgte die Inkubation von 4 facher Menge eines L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Nicotin haltigen Standardansatzes. Die über 1 Stunde parallellaufenden Ansätze wurden mit 1,0 ml 6 M HClO_4 , das im Seitenarm zupipettiert war, gefällt und evtl. gebildetes $^{14}\text{CO}_2$ aus der Lösung durch nachträgliches Schütteln von 15 Minuten ausgetrieben. Im Zentralgefäss befand sich 0,05 ml Hyamin als $^{14}\text{CO}_2$ -Fänger, das anschliessend in 5,0 ml der von DAVIDSON und FEIGELSON (6) angegebenen Szintillationsflüssigkeit im Tricarb - Spectrometer gemessen wurde.

8.) UV-und IR-Spektrographie:

Die UV Spektren wurden in einem Zeiss PMQ IV bzw. Beckmann DK2 aufgenommen.

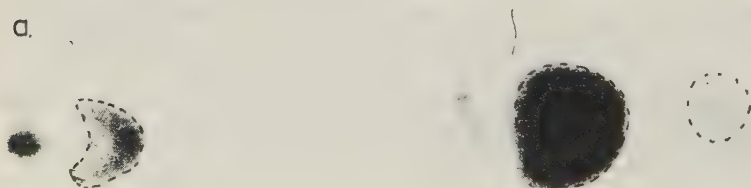
Die IR Spektren führte das Physikalisch-Chemische Institut der Universität Freiburg aus, wofür ich an dieser Stelle besonders danke.

C. Ergebnisse

1.) Versuch am Kaninchen in vivo und mit Kaninchenleberschnitten:

Einem 2-3 kg schweren Kaninchen wurde in Evipannarkose intravenös 100 μ Mol L-Nicotin injiziert und der Urin 20 Stunden lang gesammelt. Der Chloroformextrakt des alkalischen Urins enthielt als vorwiegende Nicotinmetabolite Cotinin und Nornicotin, die sich durch Dünnschichtchromatographie identifizieren ließen. Auch die Inkubation von 40 μ Mol L-Nicotin mit 10 g frischen Kaninchenleberschnitten im Robinson-Puffer führte zur Bildung der gleichen Substanzen (s. Abb. 3a).

a.



b.

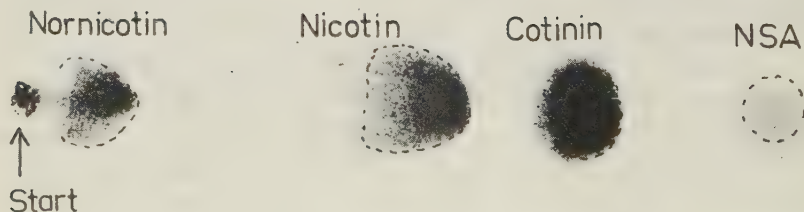


Abb. 3a: Produkte des Nicotinabbaus in Leberschnitten.

Abb. 3b: Vergleich mit authentischen Präparaten. Die

Dünnschichtchromatographie ist mit KÖNIG-Reagens entwickelt.

2.) Die Bildung von Cotinin und seine Identifizierung:

Nach der fraktionierten Zentrifugation eines isotonischen Leberhomogenats fand sich die überwiegende nicotinoxydierende Aktivität im mikrosomenhaltigen 9600 x g Überstand. HUCKER et al. (18) fanden mit diesem zellfreien Kaninchenleberextrakt die Bildung von L-Cotinin aus L-Nicotin. Dieses Ergebnis ließ sich bestätigen. Das enzymatisch gewonnene Cotinin konnte auf folgende Arten mit einem authentischen Präparat (cf. Methoden) identifiziert werden:

- a) durch papier- und dünnschichtchromatographischen Vergleich sowie das charakteristische Farbverhalten nach der KÖNIG-Reaktion.
- b) durch UV Spektrographie mit typischem Extinktionsmaximum bei 261 m μ und -minimum bei 234 m μ .
- c) durch IR Spektrographie (Abb. 4).

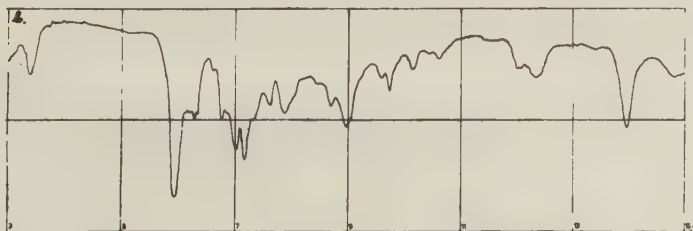
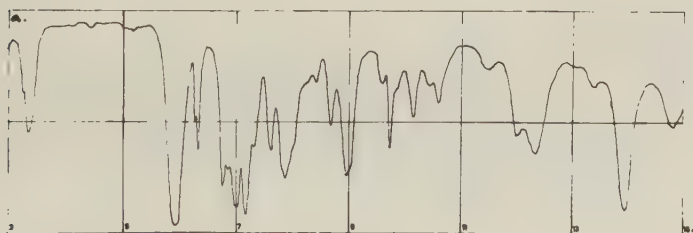


Abb. 4a: IR Spektrogramm von authentischem L-Cotinin.

Abb. 4b: IR Spektrogramm von enzymatisch gewonnenem L-Cotinin.

d) durch viermalige Kokristallisation des enzymatisch gebildeten L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Cotinins als Monopikrat mit authentischem L-Cotinin, wobei der Radioaktivitätsgehalt pro Gewichtseinheit konstant blieb (Tab. I).

	eingewogen mg	IpM	IpM/mg
1. Kokristallisation	1,5	449	299
2. "	5,5	2337	425
3. "	2,1	818	375
4. "	4,4	1643	373

Tab. I: Radioaktivitätsgehalt des enzymatisch gebildeten L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Cotinins viermal kokristallisiert mit einem authentischen Präparat.

3.) Die NADP·H₂- und O₂ -abhängige Bildung von Cotinin und

Nornicotin:

Die NADP·H₂- und O₂ -abhängige Cotininbildung, die von HUCKER (18) beschrieben wurde, konnte durch Dialyse des Enzymextraktes oder durch Inkubation in Gegenwart von Dichlorphenol-indophenol vollständig gehemmt werden. Eine Reaktivierung des Dialysates gelang durch Zusatz von Leberkochsaft bzw. NADP und Glucose-6-phosphat (Abb.5). Der nicht

dialysierte 9600 x g Überstand ist hinsichtlich des $\text{NADP}\cdot\text{H}_2$ -regenerierenden Systems gesättigt; der Zusatz dieser Komponenten führt zu keiner weiteren Aktivierung.



Die gleichen Faktoren haben auch für die Bildung von Nornicotin Geltung, sodass hier ebenso ein $\text{NADP}\cdot\text{H}_2$ -abhängiger Oxygenierungsmechanismus in Betracht gezogen werden muss. (Abb. 5)

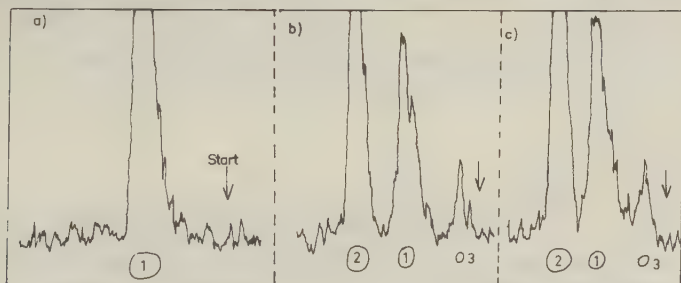


Abb. 5: Cofaktorenbedarf der $\text{DL}-[2' - ^{14}\text{C}]$ -Nicotinoxydation:

- Standardansätze a) mit dialysiertem 9600 x g Überstand;
 b) Dialysat + Leberkochsaft;
 c) Dialysat + NADP + Glucose-6-phosphat.
 1= $\text{DL}-[2' - ^{14}\text{C}]$ -Nicotin, 2= $\text{DL}-[2' - ^{14}\text{C}]$ -Cotinin,
 3= $\text{DL}-[2' - ^{14}\text{C}]$ -Nornicotin.

4.) Quantitative Entstehung von Cotinin und Nornicotin:

Ich versuchte nun, quantitative Anhaltspunkte über das relative Ausmass der Cotinin- und der Nornicotin- (bzw. Nornicotin-) Bildung zu gewinnen und verwendete dafür die Standardansätze, wobei von zwei parallellaufenden Versuchen einer mit $\text{L}-[^{14}\text{CH}_3]$ -, der andere mit $\text{DL}-[2' - ^{14}\text{C}]$ -Nicotin inkubiert wurde. (Abb. 6). Bei den hierbei verwendeten Konzentrationen von Nicotin werden 60 - 70% in Cotinin und 10 - 20% in Nornicotin

ungewandelt (Tab.I). Ein gleichartiges Ergebnis brachte ein Versuch mit einem 9600 x g Überstand aus Hundeleber. Menschliche Leber, die 48 Stunden nach dem Tode entnommen und, wie in Methoden beschrieben, aufgearbeitet und mit ^{14}C -markiertem Nicotin inkubiert wurde, zeigte keine Umsetzung.

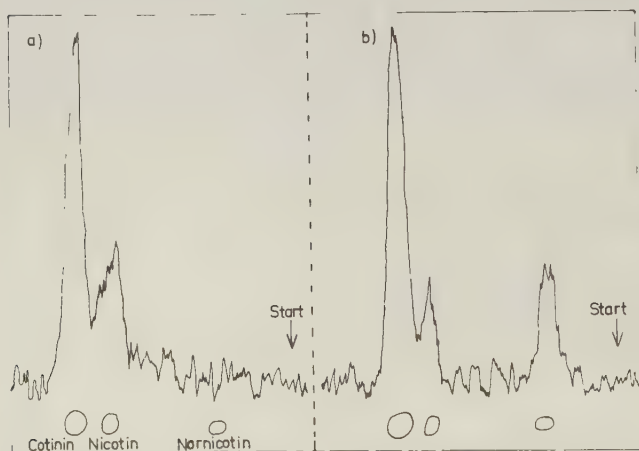


Abb.6: Vergleich der Abbauprodukte im Standardansatz:
a) mit methyl- und b) mit kernmarkiertem Nicotin.

Fraktionen der Aufarbeitung	Gemessene Radioaktivität aus Ansatz mit		Nicotin und Metabolite, markiert aus	
	$L-^{14}CH_3$ -Nicotin	$DL-2'-^{14}C$ -Nicotin	$^{14}CH_3$	$2'-^{14}C$
Gesamtansatz nach 1stündiger Inkubation	107000 IpM=100 %	107000 IpM=100 %		
Heptanextrakt	2000 IpM= 2 %	1800 IpM=1,6 %	$L-^{14}CH_3$ -Nicotin (nicht umgesetzt)	$DL-2'-^{14}C$ -Nicotin (nicht umgesetzt)
Flüssige Phase nach Heptanextraktion	105000 IpM= 98 %	97500 IpM= 91 %		
Chloroformextrakt *)	70300 IpM= 66 %	73300 IpM= 69 %	$L-^{14}CH_3$ -Cotinin	$DL-2'-^{14}C$ -Cotinin $DL-2'-^{14}C$ -Nornicotin $DL-2'-^{14}C$ -Norcotinin
Flüssige Phase nach Heptan- und Chloroformextraktion	34700 IpM= 32 %	24200 IpM= 23 %	Heptan- und chloroformunlösliche Spaltprodukte	Heptan- und chloroformunlösliche Spaltprodukte

*) Errechnet aus der Differenz des Radioaktivitätsgehaltes zwischen heptan- und chloroformextrahierter Inkubationslösung.

Tab. II: Umsetzung von $L-[^{14}CH_3]$ - bzw. $DL-[2'-^{14}C]$ -Nicotin mit mikrosomenhaltigem Kaninchenleberextrakt.

5.) Norcotininbildung aus Nornicotin:

Vergleicht man die aus der Differenz zwischen Ansätzen mit methyl- und kernmarkiertem Nicotin erhaltene Nornicotinbildung (cf. Tab. II) mit dem nach chromatographischer Isolierung gemessenen Nornicotin, so erhält man stets beträchtliche Unterschiede. Dies ist darauf zurückzuführen, daß unter unseren Versuchsbedingungen Nornicotin einem weiteren oxydativen Angriff unterliegt und dabei zum Teil in eine Substanz übergeht, deren R_f -Wert in dem angegebenen System (Dünnschichtchromatographie) mit dem des Cotinins zusammenfällt. In der spezifischen Papierchromatographie (s. Methoden) zeigte es das gleiche Verhalten wie ein authentisches Norcotinin. Die Umwandlung von enzymatisch gewonnenem $DL-[2'-^{14}C]$ -Nornicotin ($0,035 \mu\text{Mol}$, $3,6 \cdot 10^4$ IpM enthaltend) in Norcotinin

ist in der Abb. 7 deutlich zu erkennen; aus diesem Versuch läßt sich auch ermitteln, daß in 1 Stunde ca. 25% des eingesetzten Nornicotins zu Norcotinin umgesetzt wurde.

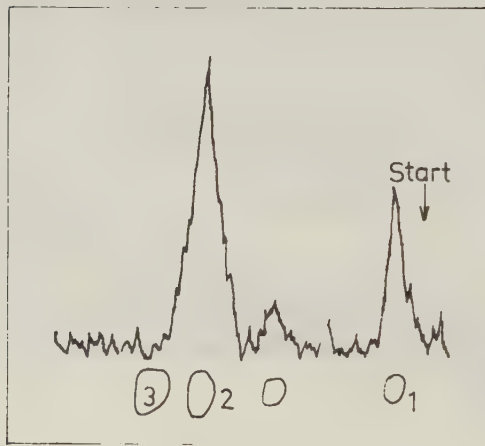


Abb. 7: DL-[2'- ^{14}C]-Norcotinⁱⁿ aus DL-[2'- ^{14}C]-Nornicotin.
1 = Nornicotin, 2 = Norcotinⁱⁿ, 3 = Nicotinsäureamid.

6.) Verlauf der Nicotinoxydation und Metabolitenentstehung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer:

Der zeitliche Verlauf des Auftretens der Nicotinmetabolite wurde durch Abstoppen der Reaktionsansätze nach verschiedenen Zeiten ermittelt und ist in der Abbildung 8 dargestellt. Es zeigte sich, daß unter den gegebenen Bedingungen schon nach 30 Minuten ein ziemlich konstantes Niveau an Cotinin und Nornicotin sich einstellte, das auch nach 1 Stunde Versuchsdauer erhalten bleibt. In dem Maße, wie der Radioakti-

vitätsgehalt in der wässrigen Inkubationsphase zunimmt, wird Nicotin über Cotinin bzw. Nornicotin zu chloroform-unlöslichen Substanzen wie zum Beispiel γ -[Pyridyl-(3)]- γ -oxo-buttersäure und Pyridyl-(3)-essigsäure abgebaut. Erst nach Verbrauch des vorgelegten Nicotins werden auch Nornicotin und in sehr langsamer Reaktion Cotinin und Norcotinin weiter umgewandelt.

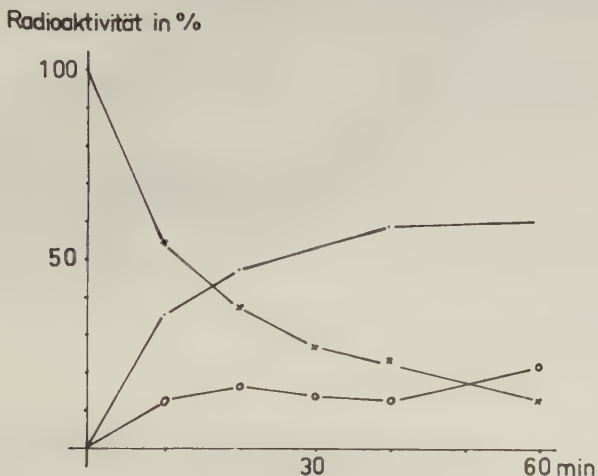


Abb. 8: Konzentrationen der Nicotinmetabolite in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. x—x Nicotin, •—• Cotinin, o—o Nornicotin. Bedingungen wie in Standardansätzen.

7.) Fragliche N'-Demethylierung auf der Stufe des Cotinins:

Die Frage, ob Cotinin in gleicher Weise wie Nicotin einer Demethylierung unterworfen wird, wurde mit enzymatisch gewonnenem L-[$^{14}\text{CH}_3$]- bzw. DL-[2'- ^{14}C]-Cotinin (0,05 μMol mit $5 \cdot 10^4 \text{ IpM}$) untersucht. Die wässrigen Phasen nach Chloro-

formextraktion der parallellaufenden Kaninchenleberansätze zeigten keine Differenz. Dementsprechend fehlt in der papierchromatographischen Analyse der Chloroformextrakte das Norcotinin. (Abb. 9) Von dem eingesetzten ^{14}C -markierten Cotinin blieben nach Chloroformextraktion in der wässrigen Inkubationsphase des $\text{L}-[^{14}\text{CH}_3]$ -Cotininansatzes 19300 IpM ($=0,019 \mu\text{M}$) bzw. des $\text{DL}-[2'-^{14}\text{C}]$ -Cotininansatzes 19600 IpM ($=0,02 \mu\text{M}$) zurück.

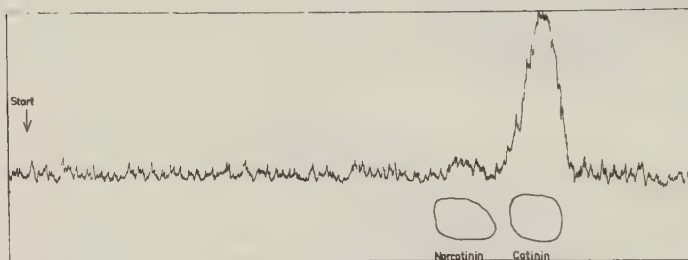


Abb. 9: Fehlende N'-Demethylierung von $\text{DL}-[2'-^{14}\text{C}]$ -Cotinin im mikrosomenhaltigen Kaninchenleberextrakt. Authentisches L-Cotinin und L-Norcotinin wurde cochromatographiert und nach KÖNIG entwickelt.

Bei einem ähnlichen Versuch mit Hundeleberhomogenat kam es dagegen zu einer Demethylierung; der Radioaktivitätsgehalt der wässrigen Inkubationsphasen nach Chloroformextraktion im $\text{DL}-[2'-^{14}\text{C}]$ -Cotininansatz betrug 9000 IpM und im $\text{L}-[^{14}\text{CH}_3]$ -Cotininansatz 14000 IpM, also eine Differenz von 5000 IpM (10%). Jedoch konnte auch hier kein $\text{DL}-[2'-^{14}\text{C}]$ -Nor-

cotinin isoliert werden. (Abb. 10). Es besteht die Möglichkeit, daß das entstandene Norcotinin schneller abgebaut als gebildet wird.

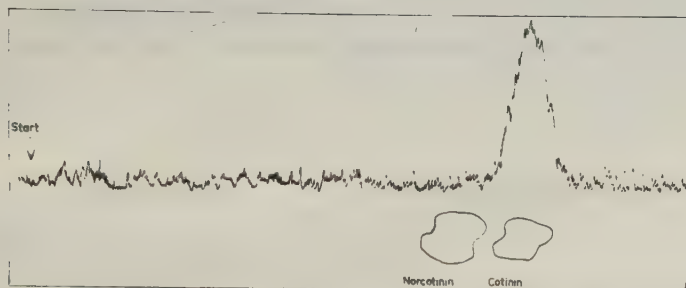


Abb. 10: Inkubation von DL-[2'- ^{14}C]-Cotinin mit Hundeleberhomogenat.

Authentisches L-Cotinin und L-Norcotinin wurde cochromatographiert und nach KÖNIG entwickelt.

8.) Die Frage nach dem Stoffwechsel der abgespaltenen

Methylgruppen:

Hinsichtlich des Mechanismus der Demethylierung konnte eine Oxygenierung der Methylgruppe mit anschließender Übertragung der Hydroxymethylgruppe auf Tetrahydrofolsäure und geeignete Akzeptoren oder unmittelbare Abspaltung von freiem Formaldehyd in Betracht gezogen werden. Für die erste Möglichkeit liessen sich keine experimentellen Anhaltspunkte finden: die Nornicotinbildung konnte durch Zusatz von Tetrahydrofolsäure und Homocystein nicht stimuliert werden; auch findet man nach Inkubation mit L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Nicotin kein der Nornicotinbildung parallelgehendes Auftreten neuer markierter Verbindungen, die durch einen Transfer der Hydroxymethylgruppe entstanden sein könnten.

9.) Die Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ und $^{14}\text{CH}_2\text{O}$ aus L- $[\text{}^{14}\text{CH}_3]$ -Nicotin-ansätzen mit mikrosomenhaltiger Kaninchenleber:

Die Entstehung von $^{14}\text{CO}_2$ (Tab. III), die man nach Inkubation mit L- $[\text{}^{14}\text{CH}_3]$ -Nicotin, nicht aber mit DL- $[\text{}^{14}\text{C}]$ -Nicotin findet und die durch Dimedonzusatz unterbunden werden kann, spricht für eine Abspaltung von freiem Formaldehyd.

Eingesetzt	IpM aus $^{14}\text{CO}_2$
L- $[\text{}^{14}\text{CH}_3]$ -Nicotin	302
DL- $[\text{}^{14}\text{C}]$ -Nicotin	27
L- $[\text{}^{14}\text{CH}_3]$ -Nicotin + Dimedon (16,2 mg)	17

Tab. III: Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ aus Nicotin durch zellfreien Leberextrakt.

Der abgespaltene, freie Formaldehyd ließ sich direkt in Enzymansätzen nachweisen, denen Dimedon als Aldehydfänger zugesetzt wurde. (Tab. IV). Aus der Tabelle IV läßt sich errechnen, daß der Umfang der Formaldehydbildung der unter den Standardbedingungen ermittelten Demethylierungsrate stöchiometrisch entspricht. Man kann daraus schliessen, daß die Bildung von Nornicotin ausschließlich durch Abspaltung von freiem Formaldehyd aus N'-Hydroxymethyl-Nicotin erfolgt.

	eingewogen mg	IpM	IpM/mg	IpM/ Mol
1. Kristallisation	37,5	17800	472	161
2. "	23,1	12200	529	180
3. "	15,3	9560	625	213
4. "	12,8	7590	592	202

Tab. IV: Radioaktivität des aus L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Nicotin gebildeten ^{14}C -Formaldomedons (cf. Methoden).

10.) Erfassung eines Zwischenproduktes der Cotininbildung aus Nicotin mit Dimedon:

Wurde ein in Gegenwart von Dimedon inkubierter Ansatz alkalisch mit Chloroform extrahiert und der Chloroformextrakt durch Dünnschichtchromatographie analysiert, so trat eine neue KÖMIG-positive Substanz auf, die sowohl bei Versuchen mit L-[$^{14}\text{CH}_3$]- als auch mit DL-[2'- ^{14}C]-Nicotin markiert war, jedoch unter den gleichen Bedingungen nicht aus L-[$^{14}\text{CH}_3$]- oder DL-[2'- ^{14}C]-Cotinin gebildet wird. (Abb. II). Eine Behandlung dieser isolierten Substanz mit Formaldehyd führte zu einem veränderten Rf-Wert in der Dünnschichtchromatographie. Die Reinkubation der mit Formaldehyd behandelten Substanz ergab mit der dünn-schichtchromatographischen Trennmethode ein Stoffwechselprodukt, das mit cochromatographiertem Cotinin den gleichen Rf-Wert besitzt.

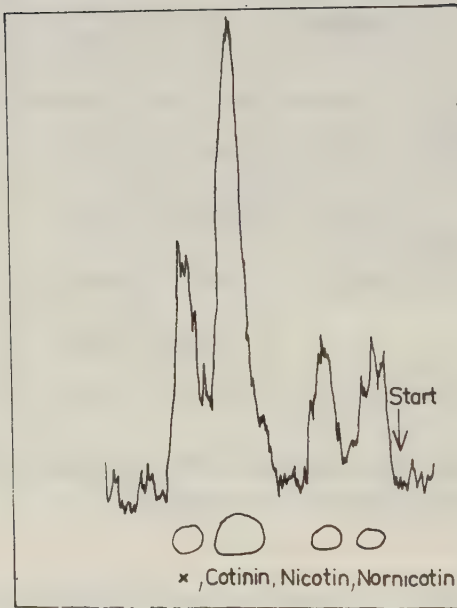
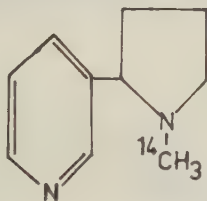


Abb. 8: Auftreten einer neuen ^{14}C -haltigen Substanz im Standardansatz mit DL- $[2' - ^{14}\text{C}]$ -Nicotin nach Di-medonzugabe (15,2 mg).

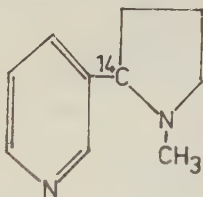
D. Diskussion

1.) Vorzüge der verwendeten Methode:

Die Verwendung unterschiedlich ^{14}C - markierter Nicotinmoleküle und die verfeinerten Trennungsmöglichkeiten durch die Dünnschichtchromatographie brachten eine wesentliche Verbesserung der Methodik mit sich und erlaubten die eindeutige Unterscheidung methylgruppenhaltiger und demethylierter Nicotinmetabolite. Die Radioanalyse parallellaufender Inkubationsansätze mit methyl- und kernmarkierten Nicotin führte zu exakten Aussagemöglichkeiten über die quantitative Entstehung der Stoffwechselprodukte Cotinin und Nornicotin. Im Vergleich mit den bisher angewandten Methoden, hatte diese Arbeitsweise einen erheblichen Zeitgewinn.



L-(2'- ^{14}C)-Nicotin



DL-(2'- ^{14}C)-Nicotin

Abb. 10: Die unterschiedlich ^{14}C - markierten Nicotinmoleküle.

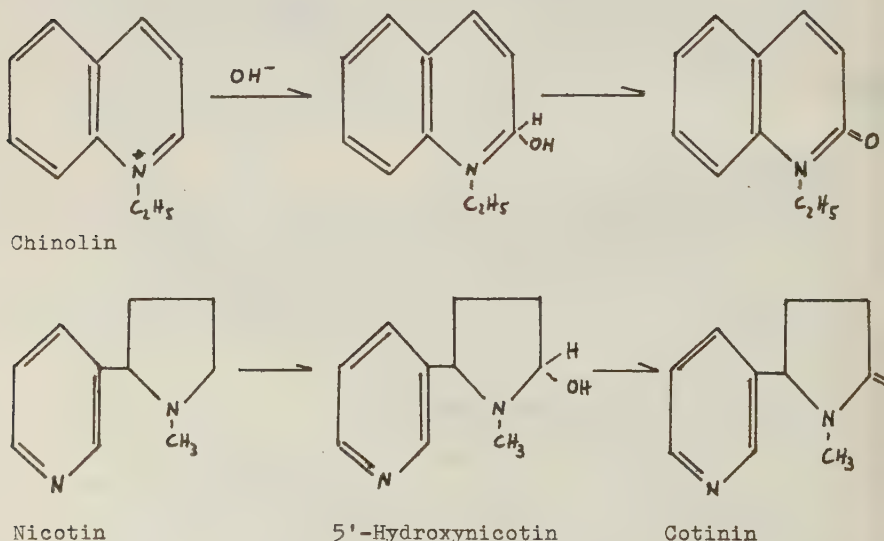
2.) Zur quantitativen Cotininentstehung:

Die überwiegende Cotininbildung, wie sie von HUCKER et al. (18) durch Inkubation von Nicotin im zellfreien, mikrosomenhaltigen Kaninchenleberextrakt gefunden worden ist, ließ sich mit völlig andersartiger Methodik bestätigen. Die von HUCKER et al. angegebene Cotininmenge, die 60% des inkubierten Nicotins beträgt, schließt Norcotinin ein, das in den verwendeten Trennverfahren von Cotinin nicht unterschieden werden kann. Die hier aufgezeichneten Ergebnisse deuten

auf eine Norcotininbildung hin, die unter den Versuchsbedingungen nahezu 5% des eingesetzten Nicotins entspricht.

3.) 5'-Hydroxynicotin als Intermediat:

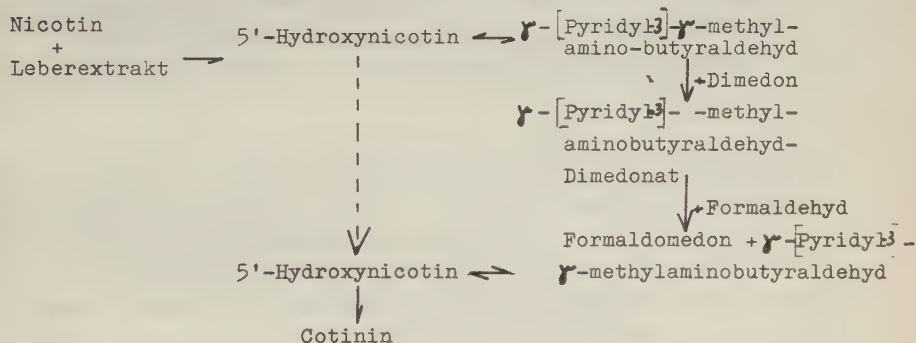
Die Frage von Zwischenprodukten im Abbauweg des Nicotins zum Cotinin ist bereits von McKENNIS und seinen Mitarbeitern (25) erörtert worden. Sie isolierten nach oralen Nicotinalgaben beim Hund aus dem Urin γ -[Pyridyl-(3)]- γ -N'-methylbuttersäure, von der sie annahmen, daß sie im neutralen pH zu Cotinin lactamisiert. HUCKER et al. (18) legte seinen Untersuchungen über die Cotininentstehung einen Reaktionsmechanismus zugrunde, der auf die gleiche Weise ablaufen sollte, wie sie von KNOX (19) für die Chinolinoxydation gefunden wurde:



Es gelang der Nachweis einer einem authentischen 5'-Hydroxynicotin papierchromatographisch gleichen Substanz mit Aldehydfunktion, die sie aus Nicotininkubation im zellfreien Kaninchenlebersystem in Gegenwart von Cyanid anreichern konnten.

Bei der in Versuchen mit Dimedonzusatz auftretenden Substanz kann es sich um die entsprechende Aldehydform des 5'-Hydroxynicotins handeln, die mit diesem im Gleichgewicht steht.

Der durch Ringaufspaltung entstandene Aldehyd kann durch Oxydation zu der von McKENNIS et al. isolierten γ -[Pyridyl-(3)]- γ -N'-methylbuttersäure, das 5'-Hydroxynicotin zu Cotinin führen. Für den letzteren Abbauweg lassen sich auf Grund der aufgezeichneten Befunde folgende Reaktionen aufstellen:



4.) Zur Frage der Cotinindemethylierung:

In den bisher veröffentlichten Arbeiten über die N'-Demethylierung nahm man an, daß der Dealkylierungsschritt auf der Oxydationsstufe des Cotinins geschehe. Tatsächlich ließ sich nach unphysiologisch hohen Dosen von Cotinin (1 g/kg) bei der Ratte wie auch beim Hund aus dem Urin Norcotinin isolieren (24). Gleiche in vivo Versuche am Menschen, allerdings mit 1,8 g L-Cotinin pro Tag oral, führten zu keinem Auftreten von Norcotinin im Urin (4). Die hier erhobenen Befunde aus Inkubationsansätzen mit L-[$^{14}\text{CH}_3$]- und DL-[2'- ^{14}C]-Cotinin zeigen deutlich, daß die Bildung von Norcotinin in der mikrosomenhaltigen Fraktion aus Kaninchen- und Hundeleber im größeren Umfange nicht stattfindet.

5.) Nornicotinbildung:

Seitdem gefunden worden ist, daß Nicotin in beträchtlichem Maße zu Nornicotin und dieses zu Norcotinin umgewandelt wird, darf als der für die N'-Demethylierung des Nicotins biologisch wichtigste Abbauweg der über Nornicotin angenommen werden. Ergebnisse anderer Arbeiten mit unterschiedlicher Methodik haben diese Befunde in jüngster Zeit bestätigt (31,32). Die Frage, ob Nornicotin ein Metabolit des Nicotins im Tierkörper ist, wurde teilweise verneint (12,18,21), von anderen Autoren dagegen für möglich gehalten (41). Die hier gefundene Nornicotinbildung beträgt beim Kaninchen ca. 15% des eingesetzten Nicotins. Nornicotin konnte sowohl im Urin nach intravenöser Nicotininjektion als auch nach Inkubation mit DL-[2'-¹⁴C]-Nicotin in Schnitten und zellfreien Präparaten aus Leber (Kaninchen und Hund) dargestellt werden.

6.) Abhängigkeit der Nornicotinbildung von NADP·H₂ und O₂:

AXELROD (1) entdeckte 1955, daß die Demethylierung des Ephedrins zum Norephedrin nur in Anwesenheit von NADP·H₂ und O₂ im Inkubationsmedium stattfindet. Daß es sich bei der Nornicotinbildung aus Nicotin um einen analogen Stoffwechselmechanismus handelt, beweist die vollständige Reaktivierbarkeit dialysierter, inaktiver Enzympräparate durch NADP - und Glucose-6-phosphatzusatz in O₂ - Atmosphäre. Der Cofaktorenbedarf ist der gleiche wie bei der Cotininbildung. Zu dem System aus Kaninchenleber, in dem PAPADOPOULOS die Nornicotinbildung (32) und HUCKER et al. die Cotininbildung (18) nachwiesen, wurde zusätzlich NADP·H₂ zugefügt. Es stellte sich heraus, daß in den hier verwendeten Leberextrakten der vorhandene NADP·H₂- und Glucose-6-phosphatspiegel völlig ausreichte. Durch weiteren Zusatz dieser Cofaktoren konnte die Nicotinumsetzung nicht gesteigert werden.

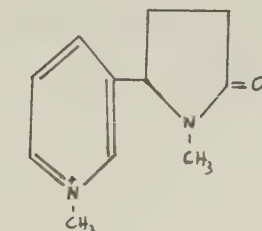
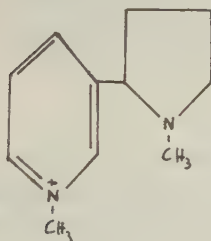
7.) Mechanismus der N'-Demethylierung:

Der erhebliche Anteil der Nornicotinbildung am Stoffwechsel des Nicotins warf die Frage nach dem Mechanismus dieser Demethylierung auf.

Für eine evtl. Transmethylierung waren zwei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen:

- 1.) eine Transmethylierung auf Akzeptoren.
- 2.) eine intramolekulare Transmethylierung.

Anhaltspunkte für diesen Mechanismus brachten in vivo Studien am Hund und Menschen, in denen nach oralen Nicotin- und Cotiningaben am Pyridinstickstoff methyliertes Nicotin und Cotinin im Urin nachgewiesen wurden (28).



Isomethylnicotinium Ion

Cotininmethonium Ion

Für die erste Vermutung ließ sich kein experimenteller Hinweis finden: die Nornicotinbildung konnte durch Zusatz von Tetrahydrofolsäure und Homocystein nicht stimuliert werden. Die zweite Möglichkeit ließ sich dadurch ausschließen, daß nach Inkubation von L-[¹⁴CH₃]-Nicotin kein der Nornicotin-entstehung parallelgehendes Auftreten neuer ¹⁴CH₃ - markierter Verbindungen (z. B. Isomethylnicotinium - und Cotininmethonium Ion) stattfindet.

Studien an Säugetieren, bei denen nach L-[¹⁴CH₃]-Nicotin-gaben aus der Respirationsluft 10-15% der eingesetzten Radio-aktivität in Form von ¹⁴CO₂ wiedergefunden wurde, liessen vermuten, daß die Demethylierung des Nicotins zum Nornicotin mit einer unmittelbaren Abspaltung als freien Formaldehyd einher-geht (15). Diese Annahme wurde durch Versuche an zellfreien Kaninchenextrakten, in denen die ¹⁴CO₂-Bildung nach Inkubation

mit L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Nicotin, nicht aber mit DL-[2'- $^{14}\text{CH}_3$]-Nicotin stattfand, bestätigt (cf. Tab. III). Darüberhinaus ließ sich der freie Formaldehyd direkt in den Enzymansätzen nachweisen, wenn die Inkubation in Gegenwart von Dimedon als Aldehydfänger durchgeführt wurde (cf. Tab. IV). Die stattgefundene Bildung von ^{14}C - Formaldomedon betrug ca. 15%. Die in den Standardansätzen ermittelte Nornicotinestehung und das Auftreten von freiem Formaldehyd verhalten sich somit stöchiometrisch. Es ist bemerkenswert, daß die von HANSSON und SCHMITTERLÖW (15) aus der Respirationsluft analysierte $^{14}\text{CO}_2$ - Menge von 10-15% in der gleichen Größenordnung liegt.

8.) Nicotin-N'- Oxyd als Zwischenstufe in der Cotinin- und Nornicotinbildung:

Der gleiche Cofaktorenbedarf der Cotinin- und Nornicotinbildung sowie die Unmöglichkeit, diese beide Prozesse durch Hemmstoffe oder partielle Inaktivierungsmethoden voneinander zu trennen, wiesen darauf hin, daß diese Oxydationsreaktionen über ein gemeinsames Zwischenprodukt verlaufen, das Nicotin-N'-Oxyd. Das 6-Hydroxyderivat dieser Verbindung wurde schon früher als Intermediat des Nicotinstoffwechsel in *Arthrobacter oxydans* postuliert (13).

Eine N-Oxydbildung beim Abbau tertiärer Basen durch Leber-michrosomen wurde auch jüngst von ZIEGLER und PETTIT (42) beschrieben.

Kürzlich gelang sogar bei der Umwandlung des Nicotins in Nornicotin in der Tabakpflanze die Isolierung des N'-Oxyd Intermediates (38). Die Umlagerung des N'-Oxydes kann nach 3 Richtungen erfolgen (Abb. 11).

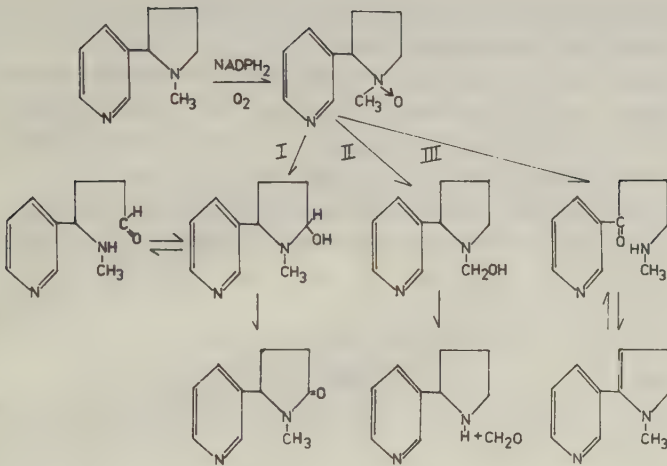


Abb. 11: Mögliche Abbauewege des Nicotins in der Säugetierleber.

Im Falle I führt sie zum 5'-Hydroxynicotin, dessen Dehydrierung Cotinin liefert; durch Reaktion II wird N'-Hydroxymethylnicotin gebildet, aus dem durch Formaldehydabspaltung Nor-nicotin entsteht. Der III. Weg ließ sich in unserem System nicht erkennen; im bakteriellen System dagegen erfolgt die Bildung von [6-Hydroxypyridyl-(3)]-(γ -methylamino-propyl)-keton, das mit 6-Hydroxy-methylmyosmin im Gleichgewicht steht, anschließend nach III.

Auch die Bildung von γ -[Pyridyl-(3)]- γ -oxo-N'-methylbutyramid, das nach Aufspaltung des Pyrrolidinringes des Cotinins entsteht (27), konnte in den Standardansätzen mit Nicotin und Cotinin nicht beobachtet werden. Es bestehen allerdings Hinweise dafür, daß in Versuchen, in denen größere Mengen Nicotin eingesetzt wurden, im Chloroformextrakt eine Substanz auftritt, die chromatographisch ähnliche Eigenschaften besitzt wie γ -[Pyridyl-(3)]- γ -oxo-N'-methylbutyramid. Jedoch zeigen die Studien von PAPADOPOULOS und KINTZIOS (32), die der obigen Versuchsanordnung entsprechen, keine Entstehung dieses Ketonamides.

9.) Geringe Substratspezifität der oxydierenden Leberenzyme:

Ein Vergleich der Umsetzungen von L- und DL- Nicotin (cf. z.B. Abb. 3) weist darauf hin, daß hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit kein Unterschied zwischen der D- und L- Form besteht. Dies zeigt, daß der Angriff auf das Nicotinmolekül in der Leber durch Enzyme mit weiter Substratspezifität erfolgt. Eine spezifische Adaptation an das Substrat ist hier nicht zu erwarten und wurde auch nicht beobachtet.

10.) Vergleich der enzymchemischen Umsetungen von Nicotin im Säugetierkörper und adaptierten Mikroorganismen:

Trotz der Gemeinsamkeit der N'-Oxyd- Bildung weisen die enzymchemischen Prozesse des Nicotinabbaus in der Säugetierleber und in adaptierten Bakterien wesentliche Unterschiede auf: im bakteriellen Stoffwechsel haben Hydroxylierungen des Pyridinringes eine große Bedeutung, die jedoch sauerstoffunabhängig sind und durch eine gekoppelte Dehydrierung und Hydratisierung zustande kommen. Im Verlaufe des Abbaus kommt es zu einer Trennung des Kohlenstoffgerüsts des Pyrrolidins vom Pyridinring; während ersterer über γ -Methylaminobuttersäure (8) den Bau- und Betriebsstoffwechsel der Zelle unterhält, wird letzterer nur bei Substratmangel weiter abgebaut, oder unter Erhaltung des Grundskeletts in Form eines blauen Farbstoffes ausgeschieden (9). Im Tierkörper wird der überwiegende Teil unter Erhalt der C_{10} - bzw. $C_9 + CH_2O$ - Struktur im Urin entfernt. Während die tierischen Organe, für deren Stoffwechsel diese Base keinerlei Bedeutung besitzt, Umwandlungen am Nicotinmolekül nur in dem Umfange durchführt, wie es die Verweilzeit der jeweiligen Metabolite erlaubt und Enzyme mit geringer Substratspezifität es ermöglichen, können sich nur solche Mikroorganismen auf Nicotin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle vermehren, die in der Lage sind, spezifische Mechanismen und Enzyme zu entwickeln, welche das Alkaloid in Zwischenprodukte des allgemeinen Zellstoffwechsels überführen. Dementsprechend findet man in

den adaptierten Bakterien eine hohe Substratspezifität der beteiligten Enzyme, die sich besonders gegenüber den optischen Antipoden des Nicotins manifestiert (19).

11.) Pharmakologische Bedeutung der Nicotinumwandlung:

Die Funktion der entgiftenden Leberenzyme ist es, vorwiegend lipoidlösliche Verbindungen in polare, harnfähige Substanzen umzuwandeln, wodurch eine toxische Anhäufung im Organismus verhindert wird. Die oxydative Umwandlung des Nicotinmoleküls in Cotinin und Nornicotin geht mit einem Verlust des pharmakodynamischen Effektes einher. So ist z. B. die Dosis letalis von Cotinin mit 930 mg/kg beim Hund 100 mal größer als die für Nicotin (5). Ähnliche pharmakologische Eigenschaften besitzt das Nornicotin (29).

Die Geschwindigkeiten, mit denen gleiche Konzentrationen der Alkaloide Nicotin, Nornicotin und Cotinin im zellfreien Kaninchenleberextrakt abgebaut werden, verhalten sich wie 100 : 75 : 40. Soweit Cotinin und Nornicotin umgesetzt worden sind, gehen sie in Substanzen über, die sich aus alkalischer Lösung nicht mehr mit Chloroform extrahieren lassen.

Zusammenfassung

Durch Vergleich der Umsetzungen von methyl- und ringmarkiertem Nicotin konnte die Bildung von Cotinin und Nornicotin nicht nur in vivo, sondern auch mit zellfreien Fraktionen der Kaninchenleber nachgewiesen werden. 10-20% des gesamten Nicotinabbaus verläuft in diesem System über Nornicotin, das teilweise zu Norcotinin oxydiert wird. Eine Demethylierung von Cotinin findet nicht statt. Die Nornicotinbildung ist mit der Abspaltung freien Formaldehyds verbunden, der durch die Leberfraktion teilweise zu CO_2 oxydiert wird.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 AXELROD, J.: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 114, 430 (1955)
- 2 AXELROD, J.: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 138, 28 (1962)
- 3 BOWMAN, E. R., E. HANSSON, L. B. TURNBULL, H. McKENNIS, JR. and
C. G. SCHMITTERLÖW, J. Pharmacol. Exptl. Therap., 143, 301 (1964)
- 4 BOWMAN, E. R. and H. McKENNIS, JR.: J. Pharmacol. Exptl. Therap.,
135, 306 (1962)
- 5 BORZELLECA, J. F., E. R. BOWMAN, H. McKENNIS, JR.: J. Pharmacol.
Exptl. Therap., 137, 313 (1962)
- 6 DAVIDSON, J. D. and P. FEIGELSON: App. Radiation and Isotopes,
2, 1 (1958)
- 7 DECKER, K.: V. Internat. Congress für Biochemie, Moskau 1961,
Abs. 5, 60, 1146.
- 8 DECKER, K. und M. BRÜHMÜLLER, unveröffentlicht.
- 9 DECKER, K., H. EBERWEIN, F. A. GRIES und M. BRÜHMÜLLER: Hoppe
Seylers Z. physiol. Chemie., 319, 279 (1960)
- 10 DECKER, K., H. EBERWEIN, F. A. GRIES und M. BRÜHMÜLLER: Biochem.
Z., 334, 227 (1961)
- 11 DECKER, K., F. A. GRIES und M. BRÜHMÜLLER: Hoppe Seylers Z.
physiol. Chemie., 323, 249 (1961)
- 12 GANZ, A., F. E. KELSEY und E. M. K. GEILING: J. Pharmacol. Exptl.
Therap., 103, 209 (1951)
- 13 GRIES, F. A., K. DECKER und M. BRÜHMÜLLER: Hoppe Seylers Z.
physiol. Chemie., 325, 229 (1961)
- 14 GRIES, F. A., K. DECKER, H. EBERWEIN und M. BRÜHMÜLLER: Biochem.
Z., 335, 285 (1961)
- 15 HANSSON, E. und C. G. SCHMITTERLÖW: J. Pharmacol. Exptl. Therap.,
137, 91 (1962)
- 16 HOCHSTEIN, L. I. und S. C. RITTENBERG: J. biol. Chem., 234, 156
(1960)
- 17 HOCHSTEIN, L. I. und S. C. RITTENBERG: J. biol. Chem., 235, 795
(1960)
- 18 HUCKER, H. B., J. R. GILLETTE and B. B. BRODIE: J. Pharmacol. Exptl.
Therap., 129, 94 (1960)
- 19 KNOX, W. E.: J. biol. Chem., 163, 699, (1946)
- 20 KÖNIG, J.: J. prakt. Chem., 83, 406 (1911)

- 21 LARSON, P.S. und H.P. HAAG: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 77, 343 (1943)
- 22 MATILLA, M. und A. VARTIAINEN: Acta Pharmacol. Toxicol., 19, 330 (1962)
- 23 McKENNIS, JR., H.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 90, 36 (1960)
- 24 McKENNIS, JR., H., L.B. TURNBULL, S.L. SCHWARTZ, E. TAMAKI and E.R. BOWMAN: J. biol. Chem., 237, 541 (1962)
- 25 McKENNIS, JR., H., L.B. TURNBULL and E.R. BOWMAN: J. Amer. Chem. Soc., 80, 6597 (1958)
- 26 McKENNIS, JR., H., L.B. TURNBULL, E.R. BOWMAN and E. WADA: J. Amer. Chem. Soc., 81, 3951 (1959)
- 27 McKENNIS, JR., H., L.B. TURNBULL, S.L. SCHWARTZ, E. TAMAKI and E.R. BOWMAN: J. biol. Chem., 237, 541 (1962)
- 28 McKENNIS, JR., H., L.B. TURNBULL and E.R. BOWMAN: J. biol. Chem., 238, 719 (1963)
- 29 MATILLA, M.: Academic Dissertation, Helsinki 1963.
- 30 MILLER, A.W. and F.S. LARSON: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 109, 218 (1953)
- 31 PAPADOPOULOS, N.M.: Canad. J. Biochem., 42, 435 (1964)
- 32 PAPADOPOULOS, N.M. and J.A. KINTZIOS: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 140, 269 (1963)
- 33 PINNER, A.: Chem. Ber., 26, 292 (1893)
- 34 RABINOWITZ, J.C. and W.E. PRICER, Jr.: J. biol. Chem., 229, 1 (1957)
- 35 RICHARDSON, S.H. and S.C. RITTENBERG: J. biol. Chem., 236, 959 (1961)
- 36 RICHARDSON, S.H. and S.C. RITTENBERG: J. biol. Chem., 236, 964 (1961)
- 37 STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie, SPRINGER, Heidelberg, 1962
- 38 STEPKA, W. and DEWEY, L.J.: PLANT PHYSIOLOGY, 39, 283 (1964)
- 39 TSUJIMOTO, A.: Folia Pharmacol. Japan, 53, 353 (1957)
- 40 WERLE, E. und E. USCHOLD: Biochem. Z., 318, 531 (1948)
- 41 WERLE, E., H. SCHIEVELBEIN und D. SPIETH: Arzneimittelforschung, 6, 322 (1956)
- 42 ZIEGLER, D.M. and F.H. PETTIT: Biochem. Biophys. Res. Comm., 15, (1964)

Lebenslauf

Am 18.5.1935 wurde ich als zweites von fünf Kindern der Eheleute Theo Sammeck und Adele, geborene Höveler, in Düsseldorf-Benrath geboren. Nach den Grundschuljahren und der Zeit bis zur Untertertia am Humanistischen Gymnasium meines Heimatortes besuchte ich das St. Michaels-Gymnasium in Monschau i./Eifel, wo ich 1955 mein Abitur bestand. Ich begann mein Medizinstudium in Bonn und machte mein Physikum im Frühjahr 1958 in Heidelberg. Nach zwei klinischen Semestern an der Nuffield Medical School in Oxford und einem Semester in Bonn wechselte ich nach Freiburg i.Br. über, wo ich im Sommer 1961 mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen beendete. Von November 1961 bis April 1964 war ich am Biochemischen Institut der Universität beschäftigt, um die Versuche der vorliegenden Arbeit durchzuführen. Mein nächstes Ziel ist die ärztliche Approbation.

